

돼지 난모세포의 단위발생에 있어서 성숙시간과 활성화 처리가 활성화와 발달에 미치는 영향

김현종 · 최선호 · 한만희 · 손동수 · 류일선 · 김인철 · 이장희 · 김일화¹ · 임경순² · 조상래[†]
축산연구소

Effects of Maturation Duration and Activation Treatments on Activation and Development of Porcine Follicular Oocytes

H. J. Kim, S. H. Choi, M. H. Han, D. S. Son, I. S. Ryu, I. C. Kim, J. H. Lee,
I. H. Kim¹, K. S. Im² and S. R. Cho[†]

National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study is a part of research that development of effective genetic resources preservation system using the *in vitro* spermatogenesis, *in vitro* insemination and culture system. We aimed for establishment of *in vitro* culture system with *in vitro* activated porcine oocytes. The porcine oocytes were matured for 48 hours in TCM199+10% FCS and activated with 7% ethanol. The activated oocytes were cultured for 7 days in TCM199+10% FCS or NCSU23+0.4% BSA medium. The activated oocytes were not developed to the blastocyst-stage in TCM199+10% FCS medium. However in NCSU23+0.4% medium, those were developed to blastocyst with 3% of treated oocytes. We extended maturation duration of porcine follicular oocytes for 48, 52, 56, 60, 64, 68, and 72 hours and activated with 7% ethanol and cultured using NCSU23+0.4% BSA medium. The six percents of activated oocytes were developed to blastocyst in 48 hours and 10% in 52 hours with comparatively low rates suggested to be not fully activated by regenerated MPF. Maturation durations from 56 hours to 68 hours supported to develop upto 11.9 ~ 18.3% of blastocysts. However the developmental rate was declined to 7.2% at 72 hours of maturation duration because of cytoplasmic deterioration. The assumed time window for activation will be 56~68 hours of maturation duration. When the matured oocytes were activated with electric pulse of 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 and 2.0kV/cm for 80 μ s, although applying the electric current once was not enough for activation, applying twice with 1.6kV/cm for 80 μ s was shown the highest developmental rate with 11.3%. When those were compared with activating methods, 15.7% of blastocyst rate was obtained in the 7% ethanol. That was higher than those in electric pulse with 9.5% and calcium ionophore method with 5.8%. In this experimental condition, the 7% ethanol treatment was the most effective method for activating porcine oocytes.

(Key words : parthenogenesis, ethanol, electric pulse, calcium ionophore, porcine)

¹ 충북대학교 수의학과(Chungbuk National University)

² 서울대학교 동물자원과학과(Seoul National University)

[†] Correspondence : E-mail : jinsilro@rda.go.kr

미수정란이 응성생식세포의 유전적 기여 없이 활성화되어 수정이 이루어진 것처럼 자성의 유전체로 배발달이 진행되는 현상을 단위발생(parthenogenesis)이라 한다(Kaufman, 1979). 미수정란이 활성화되는 조건들은 물리적 자극이나 저온 혹은 고온 충격, 전기적 충격, hyaluronidase나 pronase 같은 효소처리, 고장액이나 저장액 같은 삼투압 충격, calcium ionophore나 ionomycin, Sr^{2+} 같은 이온, 마취, 에탄올, 단백질 합성 저해제 등으로, 이들 조건들이 활성화로 이어지는 기작들은 조금씩 차이가 나는 것으로 알려져 있다(Kaufman, 1993). 최근에 이러한 단위발생 처리에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있는데, 이러한 이유는 초기 발생에 관한 연구에 응성의 영향이 배제된 배발생의 생물학적 지식들을 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 생명복제 등의 배아 생명 공학 연구에 인위적인 미수정란의 활성화 단계가 필수적이기 때문이다(Onishi 등, 2000). 미수정란은 제2감수분열 중기 상태로 수정이 이루어질 때까지 유지되는데, 이러한 감수분열 상태를 유지해 주는 효소가 metaphase promoting factor (MPF)로 알려져 있다(Liu와 Yang, 1999). 이러한 MPF의 활성화는 시간이 지나고 세포질 노화에 따라 떨어지게 되는데, 이때 활성화 처리가 용이하게 작용할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Ware 등, 1989). 그러나 세포질 노화에 따른 배발달 이후 발생할 수 있는 나쁜 영향이 예상되어(Kim 등, 1996), 최근에는 노화되기 전 핵성숙이 완성되는 시점에 6-DMAP이나 cycloheximide나 puromycin 등의 단백질 합성 저해제를 사용하여 MPF의 지속적인 생산을 억제함으로써 배발달 단계로 넘어갈 수 있게 하는 처리방법들이 활용되고 있다(Gruppen 등, 2002; Ikumi 등, 2003; Lee 등, 2004; Martinez 등, 2003; Moses와 Masui, 1994; Roh와 Hwang, 2002). 최근 6-DMAP의 돌연변이의 위험성이 보고되어 추후 규명이 필요할 것으로 생각된다(Katoh 등, 2004; Kim 등, 2004). 본 실험에서 돼지 난모세포의 적절한 활성화 처리시기와 활성화 방법, 배양액에 대한 검토를 통해 체외에서 돼지 난모세포의 활성화 및 발달조건을 알아보았다.

1. 난포란의 준비 및 체외성숙

도축장에서 암돼지에서 회수한 난소를 penicillin G (100IU/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 식염수에 담근 상태로 보온병의 온도를 30~33 $^{\circ}$ C로 유지하여 실험실로 옮겼다. 실험실에서 다시 난소를 세척한 후 물기를 제거하고 18G 주사침이 꽂힌 10ml 주사기로 외관상 2~6mm 직경인 난포들만 골라서 난포액을 흡입하여 페트리 접시에 옮겼다. 실험현미경 아래에서 여러 겹의 난구세포층이 탄탄하게 잘 부착된 균일한 색깔의 난구세포-난모세포 복합체를 선별하여 PBS로 세척하였다. 성숙배양액으로 세척한 후 약 100개의 난구-난모세포 복합체들을 1ml의 성숙배양에서 배양하였다. 난포란은 5% CO₂, 95% 공기, 38.5 $^{\circ}$ C, 높은 습도조건에서 48시간 이상 배양하였다. 성숙배양액은 TCM199에 25mM HEPES buffer, 10% 소태아혈청(Gibco, USA), 0.5 μ g/ml FSH (Sigma, USA), 100 IU/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 사용하였다.

2. 난포란의 단위발생

상기 방법으로 48시간 이상 성숙배양한 난모세포-난구세포 복합체를 hyaluronidase (Sigma, USA) 300IU가 든 phosphate-buffered saline(PBS)에서 난구세포를 제거한 난자를 신선한 PBS로 씻은 후, 7% ethanol (v/v)이 든 PBS에서 7분간 활성화시키거나, BTX Electro Cell Manipulator (Biotechnologies and Experimental Research, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 1~2.0kV/cm, 80 μ s, 1~2 pulses 전기를 통전하여 활성화시키거나, calcium ionophore 5 μ M 농도에 6분 동안 처리하여 활성화된 난모세포를 5 μ g/ml cytochalasin B (CB)가 든 TCM199+10% FCS에서 5시간 노출 후, TCM199+10% FCS 소적이나 NCSU23+0.4% BSA 소적으로 옮겨 5~7일간 배양하였다.

실험 1: 체외성숙을 48시간동안 시킨 난모세포를 7% ethanol에서 7분간 활성화시키고, 5 μ g/ml CB에 5시간 유지시킨 후 TCM199+10% FCS나

NCSU23+0.4% BSA에서 배양하여 배양액에 따른 발달율을 비교하였다.

실험 2: 체외성숙을 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72시간동안 시킨 난모세포를 7% ethanol에서 7분간 활성화시킨 후, 5µg/ml CB를 5시간 유지시킨 후 NCSU23+0.4% BSA에서 배양하여 성숙시간에 따른 발달율을 비교하였다.

실험 3: 체외성숙을 68시간동안 시킨 난모세포를 0.3M mannitol solution에서 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0kV/cm, 80µs, 1~2 pulses를 통전하여 활성화시킨 후 NCSU23+0.4% BSA에서 배양하여 통전전압과 회수에 따른 발달율을 비교하였다.

실험 4: 체외성숙을 68시간동안 시킨 난모세포를 7% ethanol에서 7분간 활성화시키거나, 전기자극을 1.6kV/cm, 80µs, 2 pulses를 통전하여 활성화시키거나, calcium ionophore 5µM 농도에 6분 동안 처리하여 활성화시킨 후 NCSU23+0.4% BSA에서 배양하여 활성화 처리에 따른 발달율을 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 돼지 난포란의 에탄올처리에 따른 단위발생에 있어서 체외배양액이 미치는 영향

단위발생란의 배양액에 따른 발달율은 Table 1과 같다. TCM199+10% FCS로 배양한 결과는 배반포기까지 발달율이 0%였으나, NCSU23+0.4% BSA 처리구에서는 처리한 난모세포의 3%, 분할란의 7.1%가 배반포기까지 발달하였다.

TCM199에 10% 소 태아 혈청을 첨가하여 배양하는 방법이 1980년대 체외수정란 생산에 널리 사

용되어 왔으며, 지금도 체외성숙에는 많은 연구실에서 TCM199에 10% FCS나 pFF를 첨가하여 사용하고 있다. 이는 TCM199 조성이 비교적 다양한 성분으로 구성되어 있고, 소 태아 혈청은 세포배양에 일반적으로 사용되고 있으며, 성장에 필요한 다양한 에너지원과 성장인자들이 들어 있어 수정란의 발달에도 도움이 될 것이라고 생각하기 때문이다. 그러나 Rosenkrans과 First (1991)에 의해 단순 배양액인 CR1aa이 보고하면서 초기배의 발달에 혈청이 오히려 발달을 저해할 수 있다는 것이 알려졌다. 그 뒤 Petters와 Well (1993)은 돼지의 수정란의 배양에 적합한 NCSU23 배양액을 개발하였다. 최근 Cui 등 (2004)은 혈청이 돼지 단위발생란의 모체 조절에서 배아 자체의 조절로 넘어가는 시기인 2~4세포기 단계를 넘어가는데 저해하며, 발달하는 배아의 세포사멸이 증가한다고 보고하였다. 이는 미확인된 다양한 성장인자들에 의한 유전자 활성의 교란이나 에너지원의 비율이 적절치 않아서 일어나는 결과일 수 있다. Edwards 등 (1997)은 단백질원으로 성분이 정확히 파악이 안 되는 혈청 대신 소 혈청 알부민을 사용한 결과 우수한 배 발달율을 얻을 수 있었다고 하였다. 본 실험에서 배양조건을 잡기 위해 다양한 에너지원, 단백질원, 성장인자들이 포함된 소 태아 혈청을 이용하였을 때, 분할율이 저조하고 배반포기까지의 배발달이 일어나지 않았으나, NCSU23에 0.4% 소 혈청 알부민을 첨가하여 배양했을 때 혈청을 첨가했을 때보다 높은 배반포 발달율을 얻은 결과는 Cui 등 (2004)와 Roh와 Hwang (2002)의 보고와 유사한 경향으로 볼 수 있다.

2. 돼지 난포란의 에탄올처리에 의한 단위발생에 있어서 체외성숙시간이 미치는 영향

저조한 배 발달율을 향상시키기 위하여 성숙시

Table 1. Effect of culture medium and protein source on activation and development of porcine follicular oocytes

Medium	No. of oocytes treated	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts	
			/total (%)	/cleaved (%)
TCM199+10% FCS	156	41 (26.3)	0/156 (0)	0/41 (0)
NCSU23+0.4% BSA	230	98 (42.6)	7/230 (3)	7/98 (7.1)

Table 2. Effect of maturation time on activation and development of porcine follicular oocytes

Duration (hr)	No. of oocytes treated	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts	
			/total (%)	/cleaved (%)
48	100	66 (66.0)	6/100 (6.0)	6/ 66 (9.1)
52	100	68 (68.0)	10/100 (10.0)	10/ 68 (14.7)
56	60	43 (71.7)	11/ 60 (18.3)	11/ 43 (25.6)
60	60	32 (53.3)	8/ 60 (13.3)	8/ 32 (25.0)
64	135	66 (48.9)	16/135 (11.9)	16/ 66 (24.2)
68	210	107 (51.0)	33/210 (15.7)	33/107 (30.8)
72	138	48 (34.8)	10/138 (7.2)	10/ 48 (20.8)

간을 연장한 후, 활성화를 유기한 결과는 Table 2와 같다. 48시간 체외성숙 후 활성화를 유기하였을 때 처리한 난모세포의 6%, 분할란의 9.1%가 배반포기까지 발달하였으며, 52시간 성숙을 유기하였을 때는 총난자수의 10%, 분할란의 14.7%, 56시간 성숙을 유기했을 때는 총난자수의 18.3%, 분할란의 25.6%, 60시간 성숙을 유기했을 때는 총난자수의 13.3%, 분할란의 25.0%, 64시간 성숙을 유기했을 때는 총난자수의 11.9%, 분할란의 24.2%, 68시간 성숙을 유기했을 때는 총난자수의 15.7%, 분할란의 30.8%, 72시간 성숙을 유기했을 때 총난자수의 7.2%, 분할란의 20.8%의 배반포기 발달을 얻을 수 있었다.

모든 미성숙난자는 제 1감수분열 전기에 머문 상태로 성숙자극이 주어질 때까지 유지된다. 호르몬 등은 미성숙난자의 세포막에 신호전달경로를 자극하여 제 1감수분열 전기상태에서 풀려나게 해주며, 궁극적으로 maturation/M-phase promoting factor (MPF)를 활성화시킨다. MPF는 모든 진핵세포의 분열 조절자로 촉매분절인 cdc2 kinase와 조절분절인 cyclin B로 구성되어 있다. MPF는 M phase의 핵막 붕괴, 염색체 응축, 방추사 형성 등에 관여하는 수많은 단백질들을 인산화시킴으로써 조절하게 된다. 이 감수분열 중기에서 지속적인 세포주기의 진행을 중단하게 하는 것은 cytoplasmic factor (cytostatic factor; CSF)라 알려진 *c-mos* proto-oncogene product인 Mos가 mitogen-activated pro-

tein kianse (MAPK)를 활성화시켜 MPF의 조절분절인 cyclin B의 파괴를 억제하여 MPF 활성을 유지시킴으로써 이루어진다(Sagata, 1998; Yamashita, 1998). 수정이 이루어질 때 투과하는 정자는 미수정란을 지속적인 발달이 가능하게 활성화시키는데, 이때 대표적인 특징이 세포 내부의 보유하고 있던 Ca^{2+} 와 배양액내의 Ca^{2+} 가 반복적으로 세포질 내로 유입되며(Kline와 Kline, 1992), CaM kinase II를 활성화시켜 Cyclin B와 Mos를 파괴시킨다(Russo 등, 1998). 이러한 환경을 인위적으로 만들 수 있는데 7% ethanol(Loi 등, 1998)이나 Sr^{2+} (Wakayama 등, 1998), 전기통전(Im 등, 1997), Ca^{2+} ionophore (Goto 등, 1999), ionomycin (Loi 등, 1998) 등을 처리하면 CSF를 불활성화시키고, Mos를 파괴하게 된다. 이러한 과정을 활성화라고 하며, 염색체가 metaphase를 유지되게 하는 MPF를 파괴시켜 배발달을 진행시킨다. 세포질의 성숙상태가 노화기일 때는 자체적으로 MPF의 생산이 저하되나(Ware 등, 1989; Hogen 등, 1991; Kikuchi 등, 1995), 성숙상태가 피크일 때는 지속적으로 MPF를 생산하기 때문에 이러한 MPF의 지속적인 생산을 유지시키는 CSF의 유지를 막는 처리를 요하게 되며, 이를 위해 단백질 합성저해제인 cycloheximide, puromycin, 핵산 생산 저해제인 6-dimethylaminopurine(6-DMAP)을 4~6시간 유지시켜 더 이상의 CSF 생산을 억제하게 할 수 있다(Moses와 Masui, 1994). 돼지 난모세포의 핵성숙

율은 44~48시간에 90% 이상이 제 2감수분열 중기에 도달하였는데 (미발표 자료), 성숙시간을 연장하였을 때 배 발달율이 증가하는 것으로 보아 MPF의 활성이 저하되는 시점에서 활성화처리가 배 발달을 유기하는데 유리한 것으로 생각되며, 72시간까지 성숙배양을 지속했을 때 분할율과 배 발달율이 떨어지는 결과는 세포질의 노화로 배 발달을 지지할 능력이 떨어진 것으로 추정된다. 단위발생을 위한 활성화 처리는 성숙시간 56시간에서 68시간 이내로 하거나, MPF의 활성을 떨어뜨리는 처리가 필요할 것으로 사료된다.

3. 돼지 난포란의 전기자극에 의한 단위발생에 있어서 통전 강도와 회수가 미치는 영향

전기자극의 강도와 회수를 달리하여 배 발생율을 검토하여 본 결과는 Table 3과 같다. 1kV/cm로 1회 통전했을 때 배 발달율이 0%였으며, 2회 통전했을 때 총난자수의 10%, 분할란의 21.1%가 배 반포기로 발달했으며, 1.2kV/cm로 1회 통전했을 때 배 발달율이 0%였으나, 2회 통전했을 때 총난자수의 7.5%, 분할란의 14.3%가 배반포기로 발달하였고, 1.4kV/cm로 1회 통전했을 때 총난자수의 6.3%, 분할란의 17.4%, 2회 통전했을 때 총난자수의 7.5%,

분할란의 15%가 배반포기로 발달하였고, 1.6kV/cm로 1회 통전했을 때 총난자수의 1.5%, 분할란의 6.3%, 2회 통전했을 때 총난자수의 11.3%, 분할란의 22.5%가 배반포기로 발달하였으며, 1.8kV/cm로 1회 통전했을 때 0%, 2회 통전했을 때 0%, 2.0kV/cm로 1회 통전했을 때 0%의 배반포기로의 발달율을 얻을 수 있었다.

난모세포의 성숙시간, 이용된 전기적 강도, 통전 회수, 통전지속시간, 이들 간의 상호작용 등이 전기적 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Zhu 등, 2002). 대부분의 연구에서 활성화 정도는 난모세포의 성숙시간이 늘어날수록 증가하는 것으로 알려져 있으며 (Bing 등, 2002), 발달에 최적인 난모세포들의 활성화 시기는 핵성숙과 세포질 성숙이 완료된 시간과 성숙된 난모세포가 퇴행하는 시간 사이로 추정된다 (Bing 등, 2003). 본 실험에서는 에탄올처리로 활성화시켰을 때 성숙시간이 56~68 시간 사이에 높은 배 발달율을 보여 핵성숙과 세포질 성숙이 완성되는 시간이 56시간 이후로 예상되며 68시간 이후에는 배 발달이 저하되는 것으로 보아 세포질 퇴행이 시작되는 시기로 추정된다. 통전을 연속해서 여러 번 통전하였을 때 더욱 좋은 결과를 보고하고 있는데, 본 실험에서도 전기적 활성화

Table 3. Effects of electric strength and repeat on activation and development of porcine follicular oocytes

Strength (kV/cm)	Repeat	No. of oocytes treated	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts	
				/total (%)	/cleaved (%)
1	1	69	19 (27.5)	0/69 (0.0)	0/19 (0.0)
	2	80	38 (47.5)	8/80 (10.0)	8/38 (21.1)
1.2	1	65	17 (26.2)	0/65 (0.0)	0/17 (0.0)
	2	80	42 (52.5)	6/80 (7.5)	6/42 (14.3)
1.4	1	64	23 (35.9)	4/64 (6.3)	4/23 (17.4)
	2	80	40 (50.0)	6/80 (7.5)	6/40 (15.0)
1.6	1	67	16 (23.9)	1/67 (1.5)	1/16 (6.3)
	2	80	40 (50.0)	9/80 (11.3)	9/40 (22.5)
1.8	1	40	10 (25.0)	0/40 (0.0)	0/10 (0.0)
	2	40	22 (55.0)	0/40 (0.0)	0/22 (0.0)
2.0	1	40	17 (42.5)	0/40 (0.0)	0/17 (0.0)

화 처리를 68시간에 처리하였을 때, 1kV/cm의 낮은 전압에서는 활성화 정도가 낮았으며, 1.8kV/cm 이상의 높은 전압에서는 세포질이 충격을 받아 퇴행하는 난모세포의 수가 높아지는 경향을 보였으며, 1회 통전에서는 배 발달율이 낮았으나, 2회 통전에서 배 발달율이 높아져 Zhu 등(2002)의 결과와 유사한 경향을 보이고 있다. 본 실험의 조건에서는 통전 지속시간을 80 μ s로 했을 때 1.6kV/cm, 2회 통전이 실험처리중 가장 높은 발생능을 유지하였다.

4. 돼지 난포란의 단위발생의 유기에서 에탄올, 전기자극 및 calcium ionophore를 이용한 활성화 처리에 따른 배 발달을 비교

활성화 처리를 달리하여 배 발달율을 비교한 결과는 Table 4와 같다. 7% ethanol로 활성화처리를 하였을 때 총난자수의 15.7%, 분할란의 30.8%가 배반포기로 발달하였으며, 전기적 자극으로 활성화 처리를 하였을 때 총난자수의 9.5%, 분할란의 19.2%, calcium ionophore로 처리하였을 때 총난자수의 5.8%, 분할란의 14.9%가 배반포기로 발달하였다. 7% ethanol로 활성화 처리한 일부 배반포는 부화단계까지 발달하였다(Fig. 1).

단위발생처리를 하면 내부 pH가 상승하게 되는데, 이에 관여되는 기작이 다른 것으로 알려져 있다. 7% 에탄올 처리에 따른 pH 상승은 Na^+/H^+ antiport와 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger 의존적이며, H^+ ATPase와는 상관없으나, calcium ionophore 처리는 외부 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 와는 관계가 없으며, 세포 내부 유리 Ca^{2+} 수준의 증가에 의존적인 것으로 추정된다 (Ruddock 등, 2000). Leal과 Liu (1998)은 에탄올로 활성화한 경우에 전기적으로 활성화한 경우보다 전핵의 형성이 빠르고 MPF/H1 kinase 활성화의 감

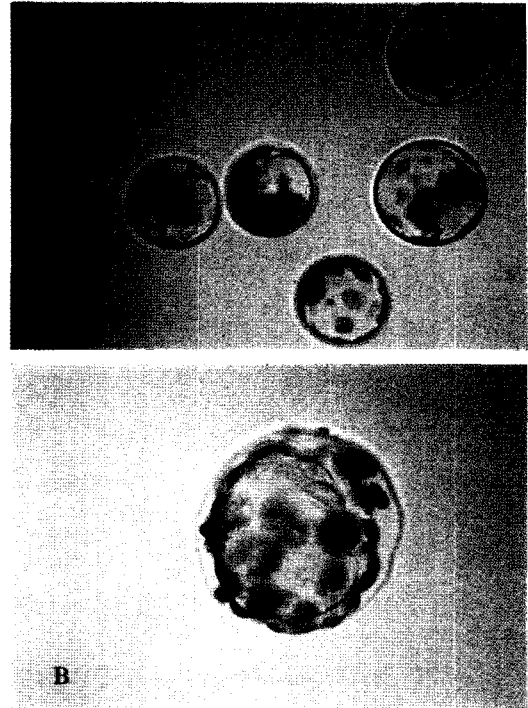


Fig. 1. Porcine parthenotes that activated with 7% ethanol and cultured in NCSU23+0.4% BSA for 7 days. A; expanded parthenogenetic blastocysts B; hatching blastocyst.

소가 느렸으며, 두 가지 활성화 처리는 다른 기작에 의해 활성화를 유지된다고 하였다. Wang 등 (1998)은 전기자극 방법과 calcium ionophore 방법을 비교한 결과 다정자 침입을 막는 투명대 경화 반응이 calcium ionophore 처리에서는 일어났으나, 전기자극 처리에서는 일어나지 않았으며, 전핵형성과 배반포 발달율이 전기자극방법에서는 87%와 11%였으나 calcium ionophore 방법에서는 62%와 5%로 낮게 나타나, 돼지 난모세포의 활성화에 관

Table 4. Comparison with activation treatments on activation and development of porcine follicular oocytes

Activation treatment	No. of oocytes treated	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts	
			/total (%)	/cleaved (%)
7% ethanol	210	107 (51.0)	33/210 (15.7)	33/107 (30.8)
Electric pulse	158	78 (49.4)	15/158 (9.5)	15/78 (19.2)
Calcium ionophore	413	161 (40.0)	24/413 (5.8)	24/161 (14.9)

여하는 기작이 다르거나 겹치는 것으로 보인다고 보고하였다. 토끼 난모세포를 calcium ionophore A23187과 thimerosal, ethanol을 처리하였을 때 작용 메커니즘은 달랐으나, 내부 calcium의 농도를 상승시키는 효과는 동일하였는데 분할율은 에탄올 처리가 다른 두 처리보다 유의적으로 높았다는 보고(Liu 등, 2002)와 들소의 난모세포 체외수정과 에탄올, ionomycin으로 처리하였을 때 에탄올처리에서 가장 높은 분할율, 배반포 발달율을 보였다는 보고가 있다(Gasparrini 등, 2004). 에탄올과 전기 자극, calcium ionophore를 직접적으로 비교한 결과 본 실험에서는 활성화되는 작용기작을 검토하지는 않았으나 다른 보고들에 의하면 활성화 기작이 다른 경로로 진행되었을 것이며 본 실험의 방법에 따라서는 에탄올처리가 가장 배발달을 촉진하였고 그 다음이 전기적 자극, 가장 낮은 발달율을 보인 처리가 calcium ionophore 처리로 나타났다.

적 요

본 연구는 가축유전자원의 효율적 보존방법의 개발을 위해 수행되는 체외 정자 세포 생산 연구의 일부로, 생산된 정자 세포의 발생능을 검사하기 위한 체외배양 시스템을 확립할 목적으로 수행되었다. 성숙 배양시간을 48시간으로 하여 7% ethanol로 활성화처리한 후 TCM199에 10%의 소 태아 혈청으로 배양하였을 때 배반포까지 발달하지 못하였으나, NCSU23에 0.4% 소 혈청 알부민으로 배양하였을 때 3%의 활성화된 난모세포가 배반포기까지 발달하였다. 성숙시간을 연장하여 48, 52, 56, 60, 64, 68, 그리고 72시간까지 성숙배양을 실시한 후 7% 에탄올로 활성화 처리하여 NCSU23+0.4% BSA로 배양하였을 때 56시간부터 68시간까지 배발달율이 증가하였으나 72시간 성숙배양할 때 배발달율이 다시 저하하여 활성화와 세포질 퇴행간의 윈도우가 56시간부터 68시간 사이인 것으로 추정되었다. 전기자극의 강도를 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 그리고 2.0kV/cm로 난모세포를 활성화 처리하였을 때 1회 통전으로는 적절한 활성화가 일어나지 않았으며 1.6kV/cm, 80 μ s, 2회 통전이 본 실험조건에서 가장 높은 배발달율을 보였다. 난모세포를 인위

적으로 활성화하는데 주로 이용되는 7% 에탄올법, 전기자극법, 그리고 calcium ionophore법을 직접적으로 비교하였을 때 7% 에탄올법이 15.7%, 전기자극법이 9.5%, calcium ionophore법이 5.8%의 배반포 발달율을 보여, 본 실험조건에서는 7% 에탄올법이 배 발달을 활성화시키는데 가장 효율적인 것으로 나타났다.

참고문헌

- Bing YZ, Che LM, Hirao Y, Takenouchi N, Kuwayama M and Nagai T. 2002. *In vitro* development of porcine oocytes activated by electric pulse: effect of maturation culture period. Cloning and Stem Cell, 3: 209 (Abstr 16-02).
- Bing YZ, Che L, Hirao Y, Takenouchi N, Rodriguez-Martinez H and Nagai T. 2003. Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone I treatment. J. Reprod. Dev., 49:159-166.
- Cui XS, Jeong YJ, Lee HY, Cheon SH and Kim NH. 2004. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. Reproduction, 127:125-130.
- Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F and Gardner DK. 1997. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. Mol. Reprod. Dev., 46:146-154.
- Gasparrini B, Boocia L, Rosa AD, Palo RD, Campanile G and Zicarelli L. 2004. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bualis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. Theriogenology, 62:1627-1637.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S, Nakane S and Kojima T. 1999. Birth of cloned

- claves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Jpn. Anim. Sci. J.*, 70:243-245.
- Gruppen CG, Mau JC, McIlpatrick SM, Maddocks S and Nottle MB. 2002. Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 62:387-396.
- Ikumi S, Asada M, Sawai K and Fukui Y. 2003. Effect of activation methods for bovine oocytes after intracytoplasmic injection. *J. Reprod. Dev.*, 49:37-43.
- Im KS, Kim HJ, Oh SJ, Yang BS and Jin DI. 1997. Effects of strength and duration of direct current (DC) pulse and age of donor embryo on fusion and development of bovine nuclear transfer embryos. *Korean J. Anim. Sci.*, 39: 493-500.
- Katoh M, Araki A, Ogura T and Valdivia RP. 2004. 6-dimethylaminopurine(6-DMAP), which is used to produce most cloned animals, is mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA1535. *Mutat. Res.*, 560:199-201.
- Kaufman MH. 1979. Mammalian parthenogenetic development. *Bibliography of Reproduction*, 33: 261-4.
- Kaufman MH. 1983. Methodology: *in vitro* and *in vivo* activation techniques. In *early mammalian development: parthenogenetic studies*. ed. MH Kaufman, pp. 20-62. Cambridge University press, England.
- Kim YS, Lee SL, Ock SA, Balasubramanian S, Choe SY and Rho GJ. 2004. Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:308-313.
- Kim NH, Moon SJ, Prather RS and Day BN. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, 43: 513-518.
- Kline D and Kline JT. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.*, 149:80-89.
- Leal CLV and Liu L. 1998. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 52:51-61.
- Lee JW, Tian XC and Yang X. 2004. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.*, 68:51-57.
- Liu CT, Chen CH, Cheng SP and Ju JC. 2002. Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli. *Anim. Reprod. Sci.*, 70:267-276.
- Liu L and Yang X. 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 61:1-7.
- Martinez Diaz MA, Suzuki M, Kagawa M, Ikeda K and Takahashi Y. 2003. Effects of cycloheximide treatment on *in vitro* development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn. J. Vet. Res.*, 50:147-155.
- Moses RM and Masui Y. 1994. Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMP). *J. Exp. Zool.*, 270:211-218.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H and Perry ACF. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188-1190.
- Petters RM and Well KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48:61-73.
- Roh SH and Hwang WS. 2002. Technical report: *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fert. Dev.*, 14:93-99.
- Rosenkrans CF and First NL. 1991. Culture of

- bovine zygotes to the blastocyst stage : effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35:266(Abstract).
- Ruddock NT, Machaty Z, Milanick M, and Prather RS. 2000. Mechanism of intracellular pH increase during parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 63:488-492.
- Russo GL, Wilding M, Marino M and Dale B. 1998. Ins and outs of meiosis in ascidians. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9:559-567.
- Sagata N. 1998. Introduction: meiotic maturation and arrest in animal oocyte. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9:535-537.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS and Day BN. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:346-353.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22:265-275.
- Yamashita M. 1998. Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9:569-579.
- Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA and Wilmut I. 2002. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66:635-641.
-
- (접수일: 2005. 1. 12 / 채택일: 2005. 3. 3)